

D2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-155194

(43) 公開日 平成7年(1995)6月20日

(51) Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F 1	技術表示箇所
C 1 2 P	21/08	9151-4B		
C 0 7 K	1/18	8318-4H		
	1/22	8318-4H		
	16/30	8318-4H		
C 1 2 P	21/00	A 9282-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平5-310253	(71) 出願人	00003001 帝人株式会社 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号
(22) 出願日	平成5年(1993)12月10日	(72) 発明者	名倉 賢治 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(72) 発明者	元木 政道 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(72) 発明者	中村 壽秀 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(74) 代理人	弁護士 前田 純博

(54) 【発明の名称】 タンパク質の精製法

(57) 【要約】

【目的】 特定の物性値を有する蛋白質に対して特に有効な、蛋白質の精製法

【構成】 (a) 目的蛋白質の等電点より低いpHで平衡化した陽イオン交換カラム、(b) アフィニティークロマトグラフィーカラム、(c) 目的蛋白質の等電点より低いpHで平衡化した陰イオン交換カラム、を用いることを特徴とする、蛋白質の精製法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に細胞や組織が含有されない細胞培養液あるいは組織抽出液などからなる目的タンパク質含有液を、下記工程(a)、(b)及び(c)をこの順序で含んでなる精製工程に試することを特徴とするタンパク質の精製法。

(a) 目的タンパク質の等電点より低いpHに調節した緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラムに該目的タンパク質含有液を供給して、液中の目的タンパク質をカラムに吸着させ、次いで非吸着物を洗浄除去後、陽イオン濃度0.05~0.5mol/Lの緩衝液を用いて前記カラムに吸着された目的タンパク質を溶出せしめる工程；

(b) アフィニティークロマトグラフィーカラムに前工程で得られた目的タンパク質溶出液を供給し、該溶出液中の目的タンパク質をカラムに吸着させ、次いで非吸着物を洗浄除去後、pHが7以下で陽イオン濃度が少なくとも0.2mol/Lの無機塩類水溶液を用いカラムに吸着した目的タンパク質を溶出せしめる工程；

(c) 目的タンパク質の等電点より低いpHに調節した緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラムに前工程で得られた目的タンパク質溶出液を供給し、該溶出液中の目的タンパク質を素通り成分として回収する工程；

【請求項2】 工程(a)に供給される目的タンパク質含有液が、細胞培養液あるいは組織抽出液を清澄濾過膜で濾過後、照外線処理により濃縮したものである請求項1記載のタンパク質の精製法。

【請求項3】 工程(c)に供給されるタンパク質溶出液が、工程(b)から得られたタンパク質溶出液をpH7以上の緩衝液で希釈してpHを上昇せしめた後、ゲル濾過処理により無機イオン濃度を減少せしめたものである、請求項1または2記載のタンパク質の精製法。

【請求項4】 工程(c)で得られたタンパク質含有液を、生理食塩水で平衡化したゲル濾過カラムに供給し、次いで生理食塩水で流出させることを特徴とする請求項1~3記載のいずれかのタンパク質の精製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はタンパク質の精製法に関する。より詳しくは特定の物理化学的性質を有するタンパク質の精製法に関する。

【0002】

【先行技術】 バイオテクノロジーの発達とともに、種々のタンパク質を生体材料から分離することや細胞培養技術により生産することが盛んに実施されており、その目的タンパク質を精製する技術も種々知られている。

【0003】 例えば、2価陽イオン結合性タンパク質の精製法（特開平2-200180）がある。この精製法では、カルシウムイオンのような2価陽イオン濃度を増減することにより陰イオン交換体をアフィニティー担体のごとく使用し、イオン交換クロマトグラフィー2段と疎水性

クロマトグラフィー1段の合計3段のクロマトグラフィーによってタンパク質の純度を98%以上に上げている。しかし、対象とするタンパク質は、（活性化）ヒトプロテインCのような2価陽イオン結合性タンパク質に限られる。

【0004】 モノクローナル抗体も巨大タンパク質分子であるが、これについてもマウス腹水から抗PC1モノクローナル抗体を精製した例（特開昭63-123395）などがある。この場合は、マウス腹腔から採取した腹水をアフィニティー担体であるプロテインAカラム1段で精製している。しかし、精製工程は1段のクロマトグラフィーだけであるため得られたモノクローナル抗体の純度が低く、実験動物等に用いるのに問題は無くとも医薬として人間に投与するには問題があった。

【0005】 一方、タンパク質と一口に言っても、分子重、イオンの挙動や各種溶媒への溶解度など物理化学的性質もいろいろである。一般にタンパク質は水溶液のpHによってその電気的な特性を変える。酸性領域では正に帯電し、アルカリ性領域では負に帯電している。正負の帯電の境目となるpHは等電点と呼ばれ、タンパク質によって固有の値をもっている。例えば、卵白アルブミンはpH4.7、ウシリボスクレアーゼはpH9である。

【0006】 本発明者らは、等電点がpH8~10である幾つかのタンパク質の精製に前記種々の精製法を適用してみたが、満足される精製度は得られなかった。特に、医薬として注射用タンパク質製剤のDNA混入量100pg/doseの基準を満足させることはできなかった。また、目的タンパク質以外の混入タンパク質に起因する抗原性も回避することもできなかった。

【0007】

【発明が解決すべき課題】 そこで上記特性を有するタンパク質の精製法について不純物の除去方法を種々検討した結果、本発明に到達した。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明は、実質的に細胞や組織が含有されない細胞培養液あるいは組織抽出液などの目的タンパク質含有液を、下記工程(a)、(b)及び(c)をこの順序で含んでなる精製工程に試することを特徴とするタンパク質の精製法である。

(a) 目的タンパク質の等電点より低いpHに調節した緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラムに該目的タンパク質含有液を供給して、液中の目的タンパク質をカラムに吸着させ、次いで非吸着物を洗浄除去後、陽イオン濃度0.05~0.5mol/Lの緩衝液を用いて前記カラムに吸着された目的タンパク質を溶出せしめる工程；

(b) アフィニティークロマトグラフィーカラムに前工程で得られた目的タンパク質溶出液を供給し、該溶出液中の目的タンパク質をカラムに吸着させ、次いで非吸着物を洗浄除去後、pHが7以下で陽イオン濃度が少なくとも0.2mol/Lの無機塩類水溶液を用いカラムに吸着した目的

タンパク質を溶出せしめる工程：

(c) 目的タンパク質の等電点より低いpHに調節した緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラムに前工程で得られた目的タンパク質溶出液を供給し、該溶出液中のタンパク質を素通り画分として回収する工程：

本発明は基本的には上記(a)、(b)及び(c)の工程をこの順序で含んでなることを特徴とする精製法であるが、各工程の前後には公知の濾過工程、濃縮工程や工程間の液の性質を調和させるための緩衝液交換工程を設けてもよい。

【0009】本発明の精製法に試されるタンパク質については特に制限はないが、本発明の特徴が最も良く発揮されるタンパク質は、等電点がpH8～10であるタンパク質、就中モノクローナル抗体である。

【0010】例えば、モノクローナル抗体を実験的規模で精製するには、当該モノクローナル抗体が特異的に認識する抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーによれば簡単であるが、工業的規模で安価に精製するには不適切である。また、抗PCIモノクローナル抗体を精製した例(特開昭63-123395)のようなプロテインAカラムのみの精製では、医薬として満足できる精製度を得ることはできなかった。

【0011】本発明を用いれば比較的安価な精製プロセスを構築できるが、本発明を適用するためには目的タンパク質の等電点を知る必要がある。目的タンパク質がどのような等電点を有するかを検討するには、実験室的規模で精製したものをを用いて予め調べることができる。

【0012】等電点は、等電点電気泳動法によって測定可能である。等電点電気泳動法の原理は幾つかの専門書(例えば、新生物化学実験講座1 タンパク質 日本生化学会編東京化学同人 1990年2月26日発行、p335)に示され、機器はファルマシア社などから購入することができる。

【0013】以下、本発明の工程(a)、(b)及び(c)について更に詳細に説明する。

工程(a)

本工程は陽イオン交換カラムを用いてタンパク質を吸着せしめ、主として目的タンパク質より低い等電点をもつ混入タンパク質、脂質および炭水化物などの夾雑物を除去することを目的とする工程である。

【0014】陽イオン交換体としては、スルホプロピル基をもつ強陽イオン交換体が推奨される。例えば、アガロース系の強陽イオン交換体であるファルマシア社製のS-SepharoseFFまたはS-SepharoseHP、シグマ社製のS-SepharoseFFらが挙げられるが、ファルマシア社製のS-SepharoseFFが特に推奨される。

【0015】本工程においては、先ずカラムを目的タンパク質の等電点より低いpH、好ましくは目的タンパク質の等電点より1～3低いpHに調節した0.001～0.05mol/Lの緩衝液で平衡化する。緩衝液としてはリン酸緩衝液

やTris緩衝液などが挙げられる。平衡化に要する緩衝液量はカラム容積によって変化するが、例えば10cmφ、1Lのカラムでは約2Lの緩衝液を流すことにより平衡化できる。

【0016】平衡化されたカラムに培養液または組織抽出液などの目的タンパク質含有液を供給するには、もちろんそのまま供給してもよいが、例えば培養液に適切な清澄濾過膜などで濾過処理を施して、細胞等が除去された培養上清を取得し、それを限外濾過処理して約10倍～100倍まで濃縮したものをを用いるのが好ましいことが多い。該濾過処理には、0.2～100μm、好ましくは、0.2～5μmの細孔径を有する清澄濾過膜(例えば、ミリポア社 ペリコンカセット ELP000C5或はフジフィルタ社 FILTRON SIGMA-SERIES 0.3μm)を用いることができる。限外濾過処理には、目的タンパク質の分子量より小さな細孔径を有するタンジェンシャルフロー形式の膜(例えば、ミリポア社 ペリコンカセット PTTK00005或はフジフィルタ社 FILTRON SIGMA-SERIES 1K～1M)を用いることができる。

【0017】本工程の収率を高く保つには、カラムに負荷する培養液や組織抽出液の無機イオン濃度を生理食塩水の半以下に減少させると良い。即ち、透析や水で希釈するなどの操作によって無機イオン濃度を下げることにより、目的タンパク質のイオン交換担体への吸着度を高めることができる。

【0018】カラムへ培養液や組織抽出液を負荷した後、目的タンパク質の等電点より若干低いpH、好ましくは目的タンパク質の等電点より0.1～1.5低いpHの緩衝液でカラム内を洗浄する。緩衝液としては、0.001～0.05mol/Lのリン酸緩衝液やTris緩衝液などが挙げられる。洗浄液のpHを目的タンパク質の等電点より若干低く調整するのは、等電点が目的タンパク質より低い混入タンパク質をできるだけ除去するためである。洗浄に要する緩衝液量はカラム容積によって変化するが、例えば10cmφ、1Lのカラムでは約2.5Lの緩衝液を流すことにより充分な洗浄が得られる。

【0019】次いで、目的タンパク質の等電点より低いpH、好ましくは目的タンパク質の等電点より0.5～1.5低いpHに調節した0.001～0.05mol/Lの緩衝液で、無機イオン濃度を中性の無機塩類(例えばNaClやKCl)で増加させたものを用い、吸着物を溶出する。無機イオン濃度は0.05～0.5mol/L、好ましくは0.20mol/Lである。緩衝液としては、平衡化や洗浄のときと同様にリン酸緩衝液やTris緩衝液などが挙げられる。目的タンパク質の脱着の様子は、280nmにおける吸光度でモニターすることができる。

【0020】目的タンパク質がカラム出口から溶出する様子は、カラム容積や目的タンパク質の担体へ吸着性などによって変化する。例えば10cmφ、1Lのカラムでモノクローナル抗体を精製する場合は、約1Lの溶出液が流

出後モノクローナル抗体水溶液約1Lが得られる。

工程(b)

本工程はアフィニティークロマトグラフィーカラムを用いてタンパク質を吸着せしめ、主として工程(a)で除去されなかった混入タンパク質、脂質および炭水化物などの夾雑物を除去することを目的とする工程である。工程(a)と(b)を組み合わせることにより、目的タンパク質以外の混入タンパク質を注射用タンパク質に使用可能なレベルまで除去できる。

【0021】アフィニティー担体としては、目的タンパク質に特異的に結合する物質を用いる。モノクローナル抗体の場合は、特異的吸着担体であるProtein-A アフィニティークロマトゲル(例えば、Repligen社製のIPA-400またはIPA-300)を使用する。一般に広く使用され実績のあるProtein-A 低漏出製のゲルを使用すべきである(例えば、ファルマシア社製Sephacrose4-FFまたはBIO PROCESSING社製のPROSEP-A)。

【0022】本工程においては、先ずカラムを平衡化する。緩衝液としてはリン酸緩衝液やTris緩衝液などが挙げられるが、無機塩類(NaClやKCl)などを含んでいても良い。工程(a)で溶出に使用した緩衝液と同じものを使用すると便利である。平衡化に要する緩衝液量はカラム容積によって変化するが、例えば10cmφ、1Lのカラムでは約2Lの緩衝液を流すことにより平衡化できる。

【0023】カラムへの負荷は、工程(a)からの溶出液をそのまま用いることができる。

【0024】次いで、平衡化に用いたのと同様の緩衝液でカラム内を洗浄する。洗浄に要する緩衝液量はカラム容積によって変化するが、例えば10cmφ、1Lのカラムでは約3Lの緩衝液を流すことにより充分な洗浄が得られる。

【0025】次に、pHが7以下、好ましくはpH3.5程度で0.5mol/L以上の無機イオン濃度である水溶液を用いカラムに吸着したタンパク質を溶出せしめる。この水溶液としては、0.05~0.5mol/Lの弱酸に0.5mol/L以上の無機塩類を加えたものを用いる。好ましくは、0.1mol/Lの酢酸に0.5mol/LのNaClを加えたものを用いる。目的タンパク質の脱着の様子は、280nmにおける吸光度からモニターすることができる。

【0026】目的タンパク質がカラム出口から溶出する様子は、カラム容積や目的タンパク質の担体への吸着性などによって変化する。例えば10cmφ、1Lのカラムでモノクローナル抗体を精製する場合は、約1Lの溶出廃液が流出後モノクローナル抗体水溶液約1Lが得られる。

【0027】得られた水溶液のpHは溶出に使用した水溶液によってpHが低いままである。目的タンパク質が酸性条件で安定である場合は放置しておいても構わないが、分解や変性の恐れがある場合は直ちにpHを中性付近まで上昇させた方がよい。pHを上昇させるためには、pH7以上に調整した0.5~1.0mol/Lのリン酸緩衝液やTris緩衝

液で1.5~5倍の希釈を行うなどの方法がある。

工程(c)

本工程では陰イオン交換カラムへ前工程で得られた溶出液を供給し、該溶出液中の目的タンパク質を素通り画分として回収する。主として、工程(b)で混入した微量のアフィニティー物質、目的タンパク質とアフィニティー物質の複合体、細胞や組織由来のDNA、およびバイロジェン(主にリポポリサッカライド)を除去することを目的とする。医薬用として生理活性タンパク質を供給するには、これらの混入物を高度に除去し、基準値未満の濃度まで低下させる必要がある。これらの混入物は、陰イオン交換クロマトグラフィーで適当な条件を設定することにより除去可能である。

【0028】陰イオン交換体としては、ジアミノエチル(DEAE)基をもつ弱陰イオン交換体が推奨される。例えば、ファルマシア社製のセルロース系陰イオン交換体DEAE-Sephacelやアガロース系陰イオン交換体DEAE-SephacroseFF、或はセルロース系陰イオン交換体であるシグマ社製のDEAE-SephacroseFFやDEAE-SephacroseCL-6Bが挙げられるが、ファルマシア社製のDEAE-Sephacelが特に推奨される。

【0029】本工程においては、先ずカラムを目的タンパク質の等電点より低いpH、好ましくは目的タンパク質の等電点より0.1~1.0低いpHに調整した0.001~0.10mol/Lの緩衝液で平衡化する。緩衝液としてはリン酸緩衝液やTris緩衝液などが挙げられる。平衡化に要する緩衝液量はカラム容積によって変化するが、例えば10cmφ、1Lのカラムでは約2Lの緩衝液を流すことにより平衡化できる。

【0030】平衡化された前工程で得られた目的タンパク質水溶液を供給するには、もちろんそのまま供給してもよいが、陰イオン交換クロマトグラフィーによる不純物除去を充分に行うためには水溶液の無機イオン濃度を低下させることが好ましいことが多い。ゲル濾過担体を用い緩衝液交換を行えば、無機イオン濃度の低下とともに不純物の混入量も低下させることができる。緩衝液交換処理には、分画分子量1万以下(好ましくは、5000以下)のゲル濾過担体(例えば、ファルマシア社製のSephadexG-25或は-15)を用いると良い。前工程で得られた目的タンパク質溶液を目的タンパク質の等電点、好ましくは目的タンパク質の等電点より0.1~1.0低いpHより低いpHに調整した0.001~0.10mol/Lの緩衝液(例えば、リン酸緩衝液やTris緩衝液)で平衡化したゲル濾過カラムに供給し、次いで同様の緩衝液で流出させることにより無機イオン濃度を減少させることができる。また、このゲル濾過処理を行う際には、サンプル負荷などに要する時間を短縮するため、限外濾過処理などにより目的タンパク質水溶液を濃縮することができる。限外濾過処理には、目的タンパク質の分子量より小さな細孔径を有するタンジェンシャルフロー形式の膜(例えば、ミ

リボア社 ペリコンカセット PTTK00005或はフジフィルター社 FILTRON SIGMA-SERIES 1K~1M)を用いると良い。

【0031】前工程で得られた目的タンパク質水溶液を陰イオン交換カラムに負荷した後、平衡化に使用したのと同様の緩衝液で目的タンパク質を流出させる。流出の様子は、280nmにおける吸光度からモニターすることができる。流出の様子はカラム容積によって変化するが、例えば10cmφ、1Lのカラム場合は、約0.5Lの流出廃液が出た後、目的タンパク質水溶液約1Lが得られる。陰イオン交換体をもう1度同様の目的で使用するには、吸着した不純物を取り除く必要がある。そのためには、pHが7未満で0.1~0.5mol/Lの緩衝液に0.5mol/L以上の無機塩類を加えたもの、好ましくは、0.17mol/Lの酢酸緩衝液に0.5mol/LのNaClを加えたものを、カラム容積の2倍以上流すと良い。

【0032】一方タンパク質を医薬として製剤化する場合、特に凍結乾燥製剤とする場合には、生理食塩水溶液とすることが好ましい場合が多い。目的タンパク質が溶解している緩衝液を生理食塩水に置換するには、ゲル濾過操作を用いることができる。これには、分画分子量1万以下、好ましくは、5000以下のゲル濾過担体（例えば、ファルマシア社製のSephadex G-25或はG-15）を用いると良い。陰イオン交換クロマトグラフィーで得られた目的タンパク質溶液を、生理食塩水で平衡化したゲル濾過カラムに供給し、次いで生理食塩水で流出させることにより、緩衝液を生理食塩水に置換することができる。また、このゲル濾過処理を行う際には、サンプル負荷などに要する時間を短縮するため、限外濾過処理などにより目的タンパク質水溶液を濃縮することができる。限外濾過処理には、目的タンパク質の分子量より小さな細孔径を有するタンジェンシャルフロー形式の膜（例えば、ミリボア社 ペリコンカセット PTTK00005或はフジフィルター社 FILTRON SIGMA-SERIES 1K~1M)を用いると良い。

【0033】以下に実施例を挙げ、本発明を更に詳細に説明する。

【0034】

【実施例】

1)ハイブリドーマの大量培養によるモノクローナル抗体の製造

モノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマとしては、V3β1P4株(微工研寄託番号:PERM BP-2765)を用いた。培地は以下の通りである。

物質:

基礎培地: eRDP(恒東製薬)

微量成分: 2mg/L-インシュリン

2mg/L-トランスフェリン

10mg/L- エタノールアミン

10⁻⁸mol/L 亜セレン酸

血清代替物: 1g/L- ポリビニルピロリドン

pH調節: 0~4.2g/L炭酸水素ナトリウム

培養槽は攪拌羽根付きの20Lタンクを用い、かつ遠心分離沈降型の細胞分離機(特公平4-25796、図3)を用いた灌流培養を行った。

【0035】ハイブリドーマV3β1P4株の抗体生産能は培養液のpHとグルコース濃度に大きく依存することがわかった。すなわちpHを7.2とし、グルコース濃度を1mmol/L以下に保つことによって最大の生産性が得られる。ここでpHは、培養槽に供給する新鮮培地中の炭酸水素ナトリウム濃度を加減することによって所定の値に制御した。グルコース濃度は灌流培養における培養液置換率、すなわち新鮮培地供給速度(=培養上清の採取速度)によって制御した。

【0036】以上の培養によってモノクローナル抗体を含む培養上清を1日当たり20~40L採取した。

【0037】2)清澄濾過による培養上清からの不溶タンパク質の除去

本操作の目的は、3)以降の限外濾過膜処理およびカラムクロマトグラフィーを円滑に行うための前処理である。すなわち培養上清中の不溶タンパク質を清澄濾過膜で除去し、限外濾過膜やカラムの閉塞を防止することが目的である。

【0038】清澄濾過膜としては、細孔径が0.45μmの清澄濾過膜(ミリボア社、ペリコンカセット HVLFP000C5)を用いた。循環ポンプにはマグネットギアポンプ(IWAKI,MDG-L15KA100)、濾液採取ポンプにはベリスタポンプ(COLE PARMER, MASTERFLEX 7553-20)を用いた。

物質:

アルカリ液: 0.5N-NaOH

中和緩衝液: 16.2g/L-酢酸ナトリウム

(3水和物)

30.5mL/L- 酢酸

濾過膜を一晚アルカリ液に浸すことにより、滅菌およびバイロジェンを分解した。循環ポンプおよび濾液採取ポンプで中和緩衝液を濾過膜に送液して、アルカリ液を中和した。

【0039】製造業者の指示に従い培養上清を濾過膜に循環させ、流出する濾液を濾液採取ポンプによって回収した。この場合、循環ポンプの流速を調節して濾過膜入口の液圧力を1.0kg/cm²程度に保てば、濾過膜の閉塞が起りにくくかつ発泡が問題とならない。

【0040】8時間の運転によって約200Lの培養上清を濾過できるが、培養上清中に細胞破砕物などが多量に含まれる場合には濾過膜が閉塞して濾過流速が著しく低下することがある。その場合には培養上清の濾過を一時中止し濾過膜内にアルカリ液を送り込んで30分程度循環することにより、閉塞の原因である濾過膜内の不溶タンパク質を可溶化できる。再び中和緩衝液でアルカリ液を中和した後に、培養上清の濾過を再開する。

【0041】約20mg/Lのモノクローナル抗体を含む240Lの培養上清を濾過し、3)以降の操作に供給した。培養上清中のモノクローナル抗体濃度は、ファルマシア社のアフィニティークラム (ProteinA-Superose, FPLC, BR16/5) を用いたHPLC(LKB社, 2152, 2150) で280nm 吸光度により測定した。

【0042】3)限外濾過による培養上清中のモノクローナル抗体の濃縮

本操作の目的は、4)の陽イオン交換クロマトグラフィー操作におけるサンプル負荷量を減少させ、精製に要する時間を短縮することにある。

【0043】限外濾過膜としては、分子量カットオフが30,000である濾過膜 (ミリポア社、ベリコンカセット P TTK00005) を用いた。循環ポンプにはマグネットギアポンプ (IWAKI, MDG-L15KA100) を使用し、濾液採取ポンプは使用せず濾液は自然流出とした。

物質:

アルカリ液: 0.5N NaOH

中和緩衝液: 16.2g/L-酢酸ナトリウム

(3水和物)

30.5mL/L-酢酸

洗浄液: 生理食塩水

2)と同様に、濾過膜を一晩アルカリ液に浸すことにより、細菌およびバイロジェンを分解した。循環ポンプで中和緩衝液を濾過膜に送液して、アルカリ液を中和した。

【0044】製造業者の指示に従い、2)で得られた濾過液培養上清を濾過膜に循環させた。この場合も、循環ポンプの流速を調節して濾過膜入口の液圧力を1.0kg/cm²程度に保てば、濾過膜の閉塞が起こりにくくかつ発泡が問題とならない。

【0045】目的とするモノクローナル抗体の分子量は150,000程度で限外濾過膜のカットオフ分子量は30,000なので、低分子成分のみが濾過膜を通過しモノクローナル抗体は濃縮される。2)で得られた240Lの濾液を約2Lまで濃縮した後、洗浄液で限外濾過膜内に残留するモノクローナル抗体を洗い出して全量を6Lとした。6L中に含まれるモノクローナル抗体は、HPLCにより4.72gと定量化された。

【0046】4)陽イオン交換クロマトグラフィーによるモノクローナル抗体の分離

V3β1F4株によって生産されるモノクローナル抗体の等電点はpH8.80~9.05程度であるため、pH8.80未満の水溶液では正に帯電している。よって、pH8.80未満の緩衝液を使用したとき、陽イオン交換体に吸着する。

物質:

カラム: ファルマシア・BPG 100/500

イオン交換体: ファルマシア・S-SepharoseFF 1L

緩衝液A: 0.02mol/L-リン酸緩衝液(pH7.0)

緩衝液B: 0.02mol/L-リン酸緩衝液(pH8.5)

緩衝液C: 0.02mol/L-リン酸緩衝液(pH8.0)

0.20mol/L-NaCl

流速: 60mL/min

製造業者の指示に従い、カラムを条件設定した。次いで、緩衝液A(カラム容積の約2倍量、約2L)でカラムを平衡化した。流出液のpHが7.0となることを、平衡化終了の目安とした。3)で得られた培養上清濃縮液6LをMilliQ水 (ミリポア社製装置による超純水) で2倍に希釈後、カラムに負荷した。

【0047】その後、緩衝液Bでカラムからの流出液のpHが8.0となるまでカラム内を洗浄した (カラム容積の約2.5倍量、約2.5L)。モノクローナル抗体のプロテアーゼ分解物 (不純物) を除去するため、緩衝液BのpHは等電点より若干低い8.5とすることが最適である。

【0048】洗浄後、緩衝液Cで吸着物を溶出した。280nmにおける吸光度からモノクローナル抗体溶出の様子をモニターした。約1Lの溶出液が流出後モノクローナル抗体が溶出し、粗モノクローナル抗体水溶液約1Lが得られた。1L中に含まれるモノクローナル抗体は、HPLCにより4.63gと定量された

【0049】5)アフィニティークロマトグラフィーによるモノクローナル抗体の分離

物質:

カラム: ファルマシア・BPG 100/500

アフィニティークロマトグラフィー: Repligen IPA-400 1L

緩衝液A: 0.02mol/L-リン酸緩衝液

0.20mol/L-NaCl(pH8.0)

緩衝液B: 0.10mol/L-酢酸

0.50mol/L-NaCl(pH3.5)

【0050】その後、緩衝液Aでカラムからの流出液のpHが8.0となるまでカラム内を洗浄した (カラム容積の約3倍量、約3L)。

流速: 60~70mL/min

製造業者の指示に従い、カラムを条件設定した。次いで、緩衝液A(カラム容積の約2倍量、約2L)でカラムを平衡化した。流出液のpHが8.0となることを、平衡化終了の目安とした。4)で得られた粗モノクローナル抗体水溶液約1Lをカラムに負荷した。

【0051】洗浄後、緩衝液Bで吸着物を溶出した。280nmにおける吸光度からモノクローナル抗体溶出の様子をモニターした。約1Lの溶出液が流出後モノクローナル抗体が溶出し、粗モノクローナル抗体水溶液約1Lが得られた。得られた水溶液のpHを中性付近まで上昇させるため、直ちに緩衝液Cで2Lまで希釈した。2L中に含まれるモノクローナル抗体は、HPLCにより4.31gと定量された。

【0052】6)限外濾過によるモノクローナル抗体の濃縮

本操作の目的は、5)の緩衝液交換操作におけるサンプル

負荷量を減少させ、精製に要する時間を短縮することにある。

【0053】限外濾過膜としては、分子量カットオフが10,000である濾過膜（フジフィルター社、フィルトロンミニセットFS002K01）を用いた。循環ポンプにはペリスタポンプ（Cole-Parmer 社、Masterflex PA25A）を使用し、濾液採取ポンプ使用せず濾液は自然流出とした。

【0054】製造業者の指示に従い、5)で得られた粗モノクローナル抗体水溶液を濾過膜に循環させた。循環ポンプの流速を調節して濾過膜入口の液圧力を1.0kg/cm²程度に保てば、発泡が問題とならず効率良く濾過できる。

【0055】目的とするモノクローナル抗体の分子量は150,000程度で限外濾過膜のカットオフ分子量は10,000なので、低分子成分のみが濾過膜を通過しモノクローナル抗体は濃縮される。5)で得られた2Lの濾液を約0.1Lまで濃縮した後、洗浄液で限外濾過膜内に残留するモノクローナル抗体を洗い出して全量を0.5Lとした。

【0056】7)ゲル濾過担体による緩衝液交換
以下の試験のために標準的なゲル濾過担体（即ち、Sephadex G-25のCoarseまたはMediumまたはFineまたはSuperfine、ファルマシア社製）を使用する。一般に広く使用され実績のある標準的なゲル濾過担体を使用すべきである（例えば、Sephadex G-25のCoarseまたはMediumまたはFineまたはSuperfine、シグマ社製）。

【0057】6)で得られた濃縮液には、0.05mol/L程度の酢酸、0.25mol/L程度のNaCl、および0.25mol/L程度のTris緩衝液が含まれる。そのため、無機イオン濃度が高く、そのままでは次工程の陰イオン交換クロマトグラフィーにおける不純物除去が不十分となる。本操作の目的は、陰イオン交換クロマトグラフィー操作に支障が出ないように無機イオン濃度を低下させることにある。ゲル濾過担体を用い緩衝液交換を行えば、無機イオン濃度の低下とともに不純物の混入量も低下させることができる。

物質：

カラム： ファルマシア・BPG 100/500
イオン交換体： ファルマシア Sephadex G-25, Medium 2 L
緩衝液A： 0.17mol/L-酢酸緩衝液(pH5.0)
緩衝液B： 0.05mol/L-Tris(pH8.3)
流速： 60~70mL/min

製造業者の指示に従い、カラムを条件設定した。カラム内のイオン交換体は予め0.2N-NaOHで滅菌されているので、緩衝液A（カラム容積の約2倍量、約4L）でカラムを中和した。流出液のpHが5.0となることを、中和終了の目安とした。次いで、緩衝液B（カラム容積の約2倍量、約4L）でカラムを平衡化した。流出液のpHが8.3となることを、平衡化終了の目安とした。6)で得られた粗モノクローナル抗体濃縮液約0.5Lをカラムに負荷した。

【0058】次いで、緩衝液Bでモノクローナル抗体を流出させた。280nmにおける吸光度からモノクローナル抗体流出の様子をモニターした。約1Lの廃液が流出後モノクローナル抗体が流出し、粗モノクローナル抗体水溶液約1Lが得られた。

【0059】8)陰イオン交換クロマトグラフィーによる不純物の除去

7)で得られた粗モノクローナル抗体水溶液には、微量のProteinA、モノクローナル抗体-ProteinA複合体、ハイブリドーマ細胞由来のDNA、およびバイロジェン（主にリポポリサッカライド）が混入している。これらの混入物は、陰イオン交換クロマトグラフィーで適当な条件を設定することにより除去可能である。

【0060】V3β1F4株によって生産されるモノクローナル抗体の等電点はpH8.80~9.05程度であるため、pH8.80未満の水溶液では正に帯電している。よって、pH8.80未満の緩衝液を使用したとき、陰イオン交換体には吸着しない。

【0061】一方、ProteinAおよびモノクローナル抗体-ProteinA複合体の等電点は、等電点電気泳動によってそれぞれ4.85~5.1、7.1~8.2であることがわかった。したがって、pH8.3以上の水溶液でProteinAおよびモノクローナル抗体-ProteinA複合体は負に帯電している。

【0062】また、DNAやバイロジェンは、水溶液中では負に帯電している。以上の事実から、pHを8.3~8.7として陰イオン交換クロマトグラフィーを行えば、目的のモノクローナル抗体のみカラムを素通りさせ不純物をイオン交換体に吸着させることが可能である。

物質：

カラム： ファルマシア・BPG 100/500
イオン交換体： ファルマシア DEAE-Sephacel 1L
緩衝液A： 0.17mol/L-酢酸緩衝液(pH5.0)
緩衝液B： 0.05mol/L-Tris(pH8.3)
緩衝液C： 0.17mol/L-酢酸緩衝液
0.50mol/L-NaCl

流速： 60mL/min

製造業者の指示に従い、カラムを条件設定した。カラム内のイオン交換体は予め0.2N-NaOHで滅菌されているので、緩衝液A（カラム容積の約2倍量、約2L）でカラムを中和した。流出液のpHが5.0となることを、中和終了の目安とした。次いで、緩衝液B（カラム容積の約2倍量、約2L）でカラムを平衡化した。流出液のpHが8.3となることを、平衡化終了の目安とした。7)で得られた粗モノクローナル抗体濃縮液約1Lをカラムに負荷した。

【0063】次いで、緩衝液Bでモノクローナル抗体を流出させた。280nmにおける吸光度からモノクローナル抗体流出の様子をモニターした。約0.5Lの廃液が流出後モノクローナル抗体が流出し、モノクローナル抗体水溶液約1Lが得られた。イオン交換体に吸着した不純物脱着

のため、緩衝液C 約2Lでカラム内を洗浄した。1L中含まれるモノクローナル抗体は、HPLCにより4.31gと定量された。

【0064】9)限外濾過によるモノクローナル抗体の濃縮

本操作の目的は、10)の緩衝液交換操作におけるサンプル負荷量を減少させ、精製に要する時間を短縮することにある。限外濾過の装置および条件は、6)に準ずる。8)で得られた約1Lの濾液を約0.1Lまで濃縮後、洗浄液で限外濾過膜内に残留するモノクローナル抗体を洗い出して全量を0.25Lとした。

【0065】10)ゲル濾過担体による緩衝液交換

モノクローナル抗体を製剤化する場合、特に凍結乾燥製剤とする場合には、生理食塩水溶液とすることが望ましい。本操作の目的は、9)で得られたモノクローナル抗体のTris緩衝液溶液を生理食塩水溶液とすることにある。

【0066】緩衝液交換の装置および条件は、7)に準ずる。

物質：

カラム： ファルマシア・BPG 100/500

イオン交換体： ファルマシア Sephadex G-25, Medium 2 L

緩衝液A： 0.17mol/L-酢酸緩衝液(pH5.0)

生理食塩水： 扶桑薬品、注射用(日本薬局方)

流速： 60mL/min

カラム内のイオン交換体は予め0.2N-NaOHで滅菌されているので、緩衝液A(カラム容積の約2倍量、約4L)でカラムを中和した。流出液のpHが5.0となることを、中

和終了の目安とした。次いで、生理食塩水(カラム容積の約3倍量、約6L)でカラムを平衡化した。平衡化後、9)で得られた粗モノクローナル抗体濃縮液約0.25Lをカラムに負荷した。

【0067】生理食塩水でモノクローナル抗体を流出させた。280nmにおける吸光度からモノクローナル抗体流出の様子をモニターした。約1Lの廃液が流出後モノクローナル抗体が流出し、最終精製モノクローナル抗体水溶液約1Lが得られた。

10 【0068】11)モノクローナル抗体の純度

10)で得られた精製モノクローナル抗体水溶液のDNA混入量をラジオアイソトープ標識によるDNAプローブ法(原理は幾つかの専門書に示されている。例えば「プロのためのハイテク情報 バイオテクノロジーシリーズ DNAプローブ 技術と応用」高橋豊三著 シーエムシー 1988年2月5日発行 p5~)で測定したところ、ハイブリドーマβ1F4株由来の混入DNAは抗体1mg当たり0.025pgであった。医薬としてモノクローナル抗体を用いる場合、この値は殆ど問題にならない低レベルの混入量である。

【0069】また、5)の操作で混入するプロテインAをELISA法で測定したところ、抗体1mg当たり0.03ng未満(検出限界以下)であった。これも、殆ど問題にならない低レベルの混入量である。

【0070】以上、本発明をモノクローナル抗体を代表例として説明したが、本発明はモノクローナル抗体に限定されず種々のタンパク質に利用することができる。

Translation (H07-155194)**[Claims]**

[Claim 1] A process for purifying a protein, which comprises subjecting a desired protein-containing liquid composed of a cell culture solution or a tissue extract solution substantially not containing cells or tissues to the following steps (a), (b), and (c) in this order:

- 5 (a) a step of feeding the desired protein-containing liquid to a cation exchange column equilibrated with a buffer solution having been adjusted to a pH lower than the isoelectric point of the desired protein to thereby adsorb the desired protein in the liquid onto the column and, after washing the column to remove non-adsorbed materials, eluting the desired protein adsorbed on the column by using a buffer solution of from 0.05 to 0.5 mol/L in cation concentration;
- 10 (b) feeding the desired protein-containing eluate obtained in the preceding step to an affinity chromatography column to thereby adsorb the desired protein in the eluate, washing the column to remove non-adsorbed materials, and eluting the desired protein adsorbed on the column by using an inorganic salt aqueous solution of 7 or less in pH and at least 0.2 mol/L in cation concentration; and
- 15 (c) a step of feeding the desired protein-containing eluate obtained in the preceding step to an anion exchange column equilibrated with a buffer solution having been adjusted to a pH lower than the isoelectric point of the desired protein to thereby recover the desired protein in the eluate as a flowthrough fraction.

[Claim 2] The process for purifying a protein as claimed in claim 1, wherein the desired protein-containing liquid to be fed to the step (a) is a liquid obtained by filtering a cell culture solution or a tissue extract solution through a

25

clarifying filter membrane and then concentrating the filtrate by ultra-filtration treatment.

[Claim 3] The process for purifying a protein as claimed in claim 1 or 2, wherein the protein-containing eluate to be fed to step (c) is a liquid obtained by
5 diluting the protein-containing eluate obtained from the step (b) with a buffer solution having a pH of 7 or more to thereby increase pH of the eluate, and then subjecting it to gel filtration treatment to thereby decrease the inorganic ion concentration.

[Claim 4] The process for purifying a protein as claimed in any of claims 1
10 to 3, wherein the protein-containing liquid obtained in the step (c) is fed to a gel filtration column equilibrated with a saline water, and then eluted with saline solution.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

15 [Field of Industrial Application]

 The present invention relates to a process for purifying a protein. More particularly, it relates to a process for purifying a protein having particular physicochemical properties.

[0002]

20 [Prior Art]

 With the progress of biotechnology, there have vigorously been conducted isolation of various proteins from biomaterials and production of various proteins by cell culture technology, and various techniques for purifying the desired proteins have also been known.

25 [0003]

For example, there is known a process for purifying a divalent cation-binding protein (JP-A-2-200180). In this purifying process, a strong anion exchange body is used like an affinity support by increasing or decreasing the concentration of a divalent cation such as calcium ion, and the
5 purity of a protein is increased to 98% or more by two-stage ion-exchange chromatography and one-stage hydrophobic chromatography, i.e., totally three-stage chromatography. However, the protein to be purified is limited to divalent cation-binding proteins such as (activated) human protein C.

[0004]

10 With a monoclonal antibody which is also a huge protein molecule, there has been an example of purifying anti-PCI monoclonal antibody from mouse hydroperitonia (JP-A-63-123395). In this case, hydroperitonia collected from abdominal cavity of mouse is purified by one-stage chromatography using a protein A column which is an affinity support.
15 However, since the purification step is mere one-stage chromatography, the resulting monoclonal antibody has such a low purity that it has been difficult to administrate it to human being as a medicine though it may be used for experimental animals.

[0005]

20 On the other hand, the term proteins include various ones having differing physicochemical properties such as molecular weight, ionic behavior, and solubility for various solvents. In general, proteins undergo change in electrical properties depending upon pH of the aqueous solution thereof. Proteins are positively charged in an acidic region, and are negatively charged
25 in an alkaline region. The pH where the net charge is zero is called the

isoelectric point, and each protein has an intrinsic isoelectric point. For example, egg albumin has an isoelectric point of pH 4.7, and bovine ribonuclease has an isoelectric point of pH 8.9.

[0006]

5 The inventors applied the above-mentioned various purifying processes to several proteins each having an isoelectric point between pH 8 and pH 10, but satisfactory purification degree was not attained. In particular, the standard as a medicine that the contamination amount of DNA in a protein preparation for injection should be 100 pg/dose was unable to be satisfied.
10 Also, it was impossible to remove antigenicity due to contaminated proteins other than the desired protein.

[0007]

[Problems that the Invention is to Solve]

15 Thus, various investigations have been made with respect to the process for removing the impurities and purifying a protein having the above-described properties and, as a result, the invention having been achieved.

[0008]

[Means for Solving the Problems]

20 The present invention is a process for purifying a protein, which comprises subjecting a desired protein-containing liquid comprising a cell culture solution or a tissue extract solution substantially not containing cells or tissues to the following steps (a), (b), and (c) in this order:

(a) a step of feeding the desired protein-containing liquid to a cation exchange
25 column equilibrated with a buffer solution having been adjusted to a pH lower

than the isoelectric point of the desired protein to thereby adsorb the desired protein in the liquid onto the column and, after washing the column to remove non-adsorbed materials, eluting the desired protein adsorbed on the column by using a buffer solution of from 0.05 to 0.5 mol/L in cation concentration;

- 5 (b) feeding the desired protein-containing eluate obtained in the preceding step to an affinity chromatography column to thereby adsorb the desired protein in the eluate, washing the column to remove non-adsorbed materials, and eluting the desired protein adsorbed on the column by using an inorganic salt aqueous solution of 7 or less in pH and at least 0.2 mol/L in cation concentration; and
- 10 (c) a step of feeding the desired protein-containing eluate obtained in the preceding step to an anion exchange column equilibrated with a buffer solution having been adjusted to a pH lower than the isoelectric point of the desired protein to thereby recover the desired protein in the eluate as a flowthrough fraction.

- 15 The invention is fundamentally a purifying process which comprises including the above-mentioned steps (a), (b), and (c) in this order. However, a known filtration step, a known concentrating step and a known buffer solution-exchanging step for well-matching the properties between the steps may be provided before or after each fundamental step.

20 [0009]

Proteins to be subjected to the purifying process of the invention are not particularly limited, but proteins with which the characteristic properties of the invention are most exhibited are those proteins which have an isoelectric point between pH 8 and pH 10, particularly, monoclonal antibodies.

25 [0010]

For example, purification of a monoclonal antibody on a laboratory scale can easily be conducted by affinity chromatography using an antigen which the monoclonal antibody specifically recognizes. However, this purification is inappropriate for purifying a monoclonal antibody inexpensively on an industrial scale. Also, purification with protein A column alone as in the example (JP-A-63-123395) of purifying anti-PCI monoclonal antibody has failed to attain a satisfactory purification degree as a medicine.

[0011]

Use of the invention permits construction of a comparatively inexpensive purifying process but, in order to apply the invention, it is necessary to know the isoelectric point of a desired protein. The isoelectric point of a desired protein can previously be measured by using a sample purified on a laboratory scale.

[0012]

The isoelectric point can be measured according to isoelectric focusing method. The principle of the isoelectric focusing method is shown in several technical books (for example, Shin Seikagaku-Jikken Koza 1, Tanpakushitu; compiled by Nihon Seikagaku-kai; published by Tokyo Kagaku Dojin; issued on Feb. 26th, 1990; p.335), and measuring devices are available from, for example, Pharmacia Co.

[0013]

The steps (a), (b), and (c) of the invention will be described in more detail below.

Step (a)

This step is a step wherein a desired protein is adsorbed on a cation

exchange column to remove mainly contaminants such as contaminated proteins having an isoelectric point lower than that of the desired protein, lipids, and hydrocarbons.

[0014]

5 As the cation exchange body, a strong cation exchange body having sulfopropyl group is recommended. Examples thereof include agarose series strong cation exchange bodies such as S-Sepharose FF or S-Sepharose HP manufactured by Pharmacia Co. and S-Sepharose FF manufactured by Sigma Co. Of these, S-Sepharose FF manufactured by Pharmacia Co. is particularly
10 recommended.

[0015]

 In this step, first, a column is equilibrated with a 0.001 to 0.05 mol/L buffer solution having a pH adjusted to a level lower than the isoelectric point of a desired protein, preferably by 1 to 3. As the buffer solution, there are
15 illustrated, for example, a phosphate buffer solution and a Tris buffer solution. The amount of the buffer solution necessary for equilibration varies depending upon the column volume but, with a column of, for example, 10 cmφ in diameter and 1 L in volume, the column can be equilibrated by eluting about 2 L of the buffer solution.

20 [0016]

 In feeding a desired protein-containing liquid such as a culture solution or a tissue extract solution to the equilibrated column, it is of course possible to feed them as such. In many cases, however, it is preferred to subject, for example, the culture solution to filtration treatment using an appropriate
25 clarifying filter membrane to obtain a culture supernatant, and concentrate the

supernatant about 10 to 100 times by ultra-filtration treatment for use. In the filtration treatment, a clarifying filter membrane having a fine pore size of from 0.2 to 100 μm , preferably from 0.2 to 5 μm , (for example, Pellikon cassette HVLP000C5 manufactured by Millipore Co. or FILTRON SIGMA-SERIES, 0.3 μm , manufactured by Fuji Filter Co.) can be employed. In the ultra-filtration treatment, a tangential flow type membrane having a fine pore size smaller than the molecular weight of the desired protein (for example, Pellikon cassette PTTK00005 manufactured by Millipore Co. or FILTRON SIGMA-SERIES 1K – 1M, manufactured by Fuji Filter Co.) can be employed.

10 [0017]

In order to maintain the yield of this step at a high level, it suffices to reduce the inorganic ion concentration of a culture solution or a tissue extract solution to be loaded on the column to a level equal to, or lower than, half the concentration of saline water. That is, the adsorption degree of the desired protein to the ion exchange support can be enhanced by reducing the inorganic ion concentration by the operation of dialysis or dilution with water.

15

[0018]

After loading the culture solution or tissue extract solution on the column, the inside of the column is washed with a buffer solution having a pH slightly lower than the isoelectric point of the desired protein, preferably by 0.1 to 1.5. As such buffer solution, there are illustrated a 0.001 to 0.05 mol/L phosphate buffer solution and a Tris buffer solution. The purpose of adjusting the pH of the washing solution to a level slightly lower than the isoelectric point of the desired protein is to remove contaminated proteins each having an isoelectric point lower than that of the desired protein as much as possible.

25

The amount of the buffer solution necessary for the washing varies depending upon the volume of column but, with a column of, for example, 10 cm ϕ in diameter and 1 L in volume, the column can be sufficiently washed by eluting about 2.5 L of the buffer solution.

5 [0019]

Subsequently, the adsorbate is eluted by using a 0.001 to 0.05 mol/L buffer solution having a pH adjusted to a level lower than the isoelectric point of the desired protein, preferably by 0.5 to 1.5, and having an inorganic ion concentration increased with a neutral inorganic salt (e.g., NaCl or KCl). The
10 inorganic ion concentration is from 0.05 to 0.5 mol/L, preferably 0.20 mol/L. As the buffer solution, there are illustrated a phosphate buffer solution and a Tris buffer solution as is the same with equilibration and washing. The state of deadsorption of the desired protein can be monitored through absorbance at 280 nm.

15 [0020]

The situation of the desired protein being eluted from the outlet of the column varies depending upon volume of the column and the adsorbing properties of the desired protein onto the support. In the case of purifying a monoclonal antibody using, for example, a column of, for example, 10 cm ϕ in
20 diameter and 1 L in volume, about 1 L of a monoclonal antibody aqueous solution is obtained after about 1 L of the elution waste liquid effuses.

Step (b)

This step is a step wherein the desired protein is adsorbed on an affinity chromatography column to remove mainly contaminants such as contaminated
25 proteins not having been removed in the preceding step (a), lipids, and

hydrocarbons. Combination of the step (a) and the step (b) serves to remove contaminated proteins other than the desired protein to a level acceptable for the use as a protein preparation for injection.

[0021]

5 As the affinity support, a material bonded specifically to the desired protein is used. With a monoclonal antibody, a specifically adsorbing carrier of Protein-A affinity chromato-gel (for example, IPA-400 or IPA-300 manufactured by Repligen Co.) is used. A gel less leaking Protein-A and having been popularly used with satisfactory results (for example, Sepharose 4-FF
10 manufactured by Pharmacia Co. or PROSEP-A manufactured by BIOPROCESSING Co.) should be used.

[0022]

 In this step, first, the column is equilibrated. As a buffer solution, there are illustrated a phosphate buffer solution and a Tris buffer solution. They
15 may contain inorganic salts (e.g., NaCl and KCl). It is convenient to use the same buffer solution as is used for eluting in the step (a). The amount of the buffer solution necessary for equilibration varies depending upon the volume of column but, with a column of, for example, 10 cm ϕ in diameter and 1 L in volume, the column can be equilibrated by effusing about 2 L of the buffer
20 solution.

[0023]

 Upon loading onto the column, the eluate from the step (a) can be used as such.

[0024]

25 Subsequently, the inside of the column is washed with a buffer solution

similar to that used in the equilibration. The amount of the buffer solution necessary for the washing varies depending upon the volume of column but, with a column of, for example, 10 cm ϕ in diameter and 1 L in volume, the column can be sufficiently washed by effusing about 3 L of the buffer solution.

5 [0025]

Then, the protein adsorbed on the column is eluted by using an aqueous solution having a pH of 7 or less, preferably about 3.5 and having an inorganic ion concentration of 0.5 mol/L or more. As this aqueous solution, an aqueous solution prepared by adding 0.5 mol/L or more inorganic salt to a 0.05
10 to 0.5 mol/L weak acid solution is used. Preferably, an aqueous solution prepared by adding 0.5 mol/L NaCl to a 0.1 mol/L acetic acid solution. The state of deadsorption of the desired protein can be monitored through absorbance at 280 nm.

[0026]

15 The situation of the desired protein being eluted from the outlet of the column varies depending upon volume of the column and the adsorbing properties of the desired protein onto the support. In the case of purifying a monoclonal antibody using, for example, a column of, for example, 10 cm ϕ in diameter and 1 L in volume, about 1 L of a monoclonal antibody aqueous
20 solution is obtained after about 1 L of the elution waste liquid effuses.

[0027]

The pH of the thus-obtained aqueous solution remains at a low level due to the aqueous solution used for elution. In the case where the desired protein is stable under acidic conditions, the aqueous solution may be allowed
25 to stand but, in the case where the desired protein might be decomposed or

denatured, the pH may be preferably immediately increased to about neutrality. As a method for increasing the pH, there is a method of diluting 1.5 to 5 times with a 0.5 to 1.0 mol/L phosphate buffer solution or Tris buffer solution having been adjusted to pH 7 or more.

5 Step (c)

 In this step, the eluate obtained in the preceding step is fed to an anion exchange column to recover the desired protein contained in the eluate as a flowthrough fraction. In this step, it is mainly intended to remove a trace amount of affinity substance having contaminated in the step (b), a composite
10 between the desired protein and the affinity substance, DNAs derived from cells or tissues, and pyrogens (mainly lipopolysaccharides). In supplying a physiologically active protein for a medicinal use, it is necessary to highly remove the contaminants to a level less than the standard level. These contaminants can be removed by employing appropriate conditions in the anion
15 exchange chromatography.

[0028]

 As the anion exchange body, a weak anion exchange body having diaminoethyl group (DEAE) is recommended. Examples thereof include cellulose series anion exchange body of DEAE-Sephacel and agarose series
20 anion exchange body of DEAE-Sepharose FF, manufactured by Pharmacia Co., and cellulose series anion exchange body of DEAE-Sepharose FF and DEAE-Sepharose CL-68, manufactured by Sigma Co., with DEAE-Sephacel manufactured by Pharmacia Co. being particularly recommended.

[0029]

25 In this step, first, a column is equilibrated with a 0.001 to 0.10 mol/L

buffer solution having a pH adjusted to a level lower than the isoelectric point of the desired protein, preferably by 0.1 to 1.0. As the buffer solution, there are illustrated, for example, a phosphate buffer solution and a Tris buffer solution. The amount of the buffer solution necessary for equilibration varies depending upon the column volume but, with a column of, for example, 10 cmφ in diameter and 1 L in volume, the column can be equilibrated by eluting about 2 L of the buffer solution.

[0030]

In feeding a desired protein-containing aqueous solution equilibrated and obtained by the preceding step, it is of course possible to feed them as such. In many cases, however, it is preferred to reduce the inorganic ion concentration of the aqueous solution in order to sufficiently remove impurities by the anion exchange chromatography. Both reduction of the inorganic ion concentration and reduction of the amount of contaminating impurities can be achieved by exchanging the buffer solution using a gel filtration support. In the buffer solution-exchanging treatment, it suffices to use a gel filtration support having a molecular weight cut off (MWCO) of 10,000 or less (preferably 5,000 or less) (e.g., Sephadex G-25 or -15 manufactured by Pharmacia Co.). The inorganic ion concentration can be reduced by feeding the desired protein-containing solution obtained in the preceding step to a gel filtration column having been equilibrated with a 0.001 to 0.10 mol/L buffer solution having a pH adjusted to a level lower than the isoelectric point of the desired protein, preferably by 0.1 to 1.0 (for example, a phosphate buffer solution or a Tris buffer solution), and then eluting with the similar buffer solution. Also, upon conducting this gel filtration treatment, the desired protein-containing

aqueous solution can be concentrated by, for example, ultra-filtration treatment in order to shorten the time required for sample loading. In the ultra-filtration treatment, use of a tangential-flow type membrane having a fine pore size smaller than the molecular weight of the desired protein (e.g., Pellikon cassette
5 PTTK00005 manufactured by Millipore Co. or FILTRON SIGMA-SERIES 1K – 1M manufactured by Fuji Filter Co.) is convenient.

[0031]

After loading the desired protein-containing aqueous solution obtained in the preceding step on the anion exchange column, the desired protein is
10 eluted with the same buffer solution as is used for the equilibration. The state of elution of the desired protein can be monitored through absorbance at 280 nm. The situation of the desired protein being eluted from the outlet of the column varies depending upon volume of the column. In the case of using a column of, for example, 10 cmφ in diameter and 1 L in volume, about 1 L of a
15 desired protein-containing aqueous solution is obtained after about 0.5 L of the elution waste liquid effuses. In order to re-use the anion exchange body for the same purpose, it is necessary to remove adsorbed impurities. For this purpose, it suffices to effuse a 0.1 to 0.5 mol/L buffer solution having a pH of less than 7 to which 0.5 mol/L or more inorganic salts have been added,
20 preferably a 0.17 mol/L acetate buffer solution to which 0.5 mol/L of NaCl has been added, in an amount equal to, or more than, two times as much as the column volume.

[0032]

On the other hand, in the case of forming a medicinal preparation,
25 particularly a freeze-dried preparation, from the protein, it is preferred in many

cases to prepare a protein-containing saline solution. In order to replace the buffer solution, in which the protein is dissolved, by saline solution, gel filtration procedure can be employed. For this procedure, use of a gel filtration support having a molecular weight cut off (MWCO) of 10,000 or less, preferably 5,000 or less (for example, Sephadex G-25 or G-15 manufactured by Pharmacia Co.) is convenient. The buffer solution can be replaced by saline solution by feeding the desired protein-containing aqueous solution obtained by the anion exchange chromatography to a gel filtration column equilibrated with saline solution, then eluting with saline solution. Upon conducting this gel filtration treatment, the desired protein-containing aqueous solution can be concentrated by, for example, ultra-filtration treatment in order to shorten the time required for sample loading. In the ultra-filtration treatment, use of a tangential-flow type membrane having a fine pore size smaller than the molecular weight of the desired protein (e.g., Pellikon cassette PTTK00005 manufactured by Millipore Co. or FILTRON SIGMA-SERIES 1K – 1M manufactured by Fuji Filter Co.) is convenient.

[0033]

The invention will be described in more detail by reference to Examples below.

[0034]

[Examples]

1) Preparation of a monoclonal antibody by large-scale culture of hybridoma

As a monoclonal antibody-producing hybridoma, V3β1F4 strain (Fermentation Research Institute deposit No. FERM BP-2765) was used. The used medium is as follows.

Substances:

Base medium: eRDF (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.)

Trace-amount components: 2 mg/L-insulin; 2 mg/L-transferrin; 10 mg/L-ethanolamine; 10^{-8} mol/L selenous acid

5 Serum substitute: 1 g/L-polyvinylpyrrolidone

Adjustment of pH: 0 to 4.2 g/L sodium hydrogencarbonate

As a culture tank, a 20-L tank equipped with an agitation vane was used, and perfusion culture was conducted by using a centrifugal precipitation type cell separator (JP-B-4-25796, Fig. 3).

10 [0035]

It has been found that the ability of hybridoma V3 β 1F4 to produce antibody greatly depends upon pH and glucose concentration of the culture liquor. That is, the maximum productivity can be obtained by adjusting the pH to 7.2 and maintaining the glucose concentration at a level of 1 mmol/L or less.

15 Here, the pH was controlled to a predetermined level by increasing or decreasing the concentration of sodium hydrogencarbonate in a fresh medium to be fed to the culture tank. The glucose concentration was controlled by adjusting the culture liquor-replacing ratio in the perfusion culture, i.e., by adjusting the rate of feeding a fresh medium (=rate of withdrawing the culture
20 supernatant).

[0036]

A culture supernatant containing the monoclonal antibody was collected in an amount of from 20 to 40 L per day by the above-mentioned culture.

25 [0037]

2) Removal of insoluble proteins from the culture supernatant by clarifying filtration

An object of this procedure is to conduct pre-treatment for smoothly conducting subsequent ultra-filtration membrane treatment and column chromatography. That is, it is intended to remove insoluble proteins contained
5 in the culture supernatant by the clarifying filter membrane to thereby prevent clogging of the ultra-filtration membrane and the column.

[0038]

As the clarifying filter membrane, a clarifying filter membrane having a
10 fine pore size of 0.45 μm (Pellikon cassette HVLP000C5; manufactured by Millipore Co.) was used. As a circulating pump, a magnet gear pump (MDG-L15KA100 manufactured by IWAKI) was used and, as a filtrate-withdrawing pump, a perista pump (MASTERFLEX 7553-20 manufactured by COLE PARMER was used.

15 Substances:

Alkaline solution: 0.5N-NaOH

Neutralizing buffer solution: 16.2 g/L-sodium acetate (trihydrate), 30.5 ml/L-acetic acid

The filter membrane was dipped in the alkaline solution overnight to
20 thereby sterilize and decompose pyrogens. The neutralizing buffer solution was fed to the filter membrane by means of the circulating pump and the filtrate-withdrawing pump to thereby neutralize the alkaline solution.

[0039]

The culture supernatant was circulated through the filter membrane,
25 and the effusing filtrate was recovered by means of the filtrate-withdrawing

.....

pump, following the manufacturer's instruction. In this case, clogging of the filter membrane was difficult to occur, and foaming did not matter, by adjusting the flow rate of the circulating pump so that the liquid pressure at the inlet of the filter membrane was kept at about 1.0 kg/cm².

5 [0040]

About 200 L of the culture supernatant was filtered by 8-hour operation. In the case where a large amount of cell-crushed products are contained in the culture supernatant, the filter membrane might be clogged to seriously reduce the filtration flow rate. In such a case, insoluble proteins within the filter
10 membrane, which is the cause of clogging, can be solubilized by temporarily stopping filtration of the culture supernatant and introducing the alkaline solution into the inside of the filter membrane by circulating the solution for about 30 minutes. After neutralizing the alkaline solution with the neutralizing buffer solution, filtration of the culture supernatant is re-started.

15 [0041]

240 L of the culture supernatant containing about 20 mg/L of the monoclonal antibody was filtered and was fed to the procedure of 3) and subsequent procedures. The concentration of the monoclonal antibody in the culture supernatant was measured by means of HPLC (2152, 2150
20 manufactured by LKB) using an affinity column (Protein A-Superose, FPLC, HR16/5) manufactured by Pharmacia Co. in terms of an absorbance at 280 nm.

[0042]

3) Concentration of the monoclonal antibody in the culture supernatant by ultra-filtration

25 An object of this procedure is to reduce the sample-loading amount in

the procedure of 4) to conduct cation exchange chromatography, thus shortening the time required for purification.

[0043]

As the ultra-filtration membrane, a filter membrane having a molecular
5 weight cut off of 30,000 (Pellikon cassette PTTK00005, manufactured by
Millipore Co.) was used. As the circulating pump, a magnet gear pump
(MDG-L15KA100 manufactured by IWAKI) was used. The filtrate was allowed
to flow out with using no filtrate-withdrawing pump.

Substances:

10 Alkaline solution: 0.5N-NaOH

Neutralizing buffer solution: 16.2 g/L-sodium acetate (trihydrate), 30.5
ml/L-acetic acid

Washing solution: saline solution

The filter membrane was dipped in the alkaline solution overnight as in
15 2) to thereby sterilize and decompose pyrogen. The neutralizing buffer
solution was fed to the filter membrane by means of the circulating pump to
thereby neutralize the alkaline solution.

[0044]

The culture supernatant obtained in 2) was circulated through the filter
20 membrane, following the manufacturer's instruction. In this case, too, clogging
of the filter membrane was difficult to occur, and foaming did not matter, by
adjusting the flow rate of the circulating pump so that the liquid pressure at the
inlet of the filter membrane was kept at about 1.0 kg/cm².

[0045]

25 The molecular weight of the desired monoclonal antibody is about

150,000, and the cut-off molecular weight of the ultra-filtration membrane is 30,000. Therefore, only components having a low molecular weight pass through the filter membrane, and the monoclonal antibody is concentrated. After concentrating 240 L of the filtrate obtained in 2) to about 2 L, the
5 monoclonal antibody remaining within the ultra-filtration membrane was washed out with the washing solution to obtain 6 L of a solution in total amount. The monoclonal antibody contained in 6L of the solution was determined to be 4.72 g by HPLC.

[0046]

10 4) Separation of the monoclonal antibody by cation exchange chromatography

The monoclonal antibody produced by V3 β 1F4 strain has an isoelectric point of about pH 8.80 to about 9.05, thus being positively charged in an aqueous solution of less than 8.80 in pH. Therefore, when a buffer solution having a pH of less than 8.80 is used, the monoclonal antibody adsorbs on the
15 cation exchange body.

Substances:

Column: Pharmacia, BPG 100/500

Ion exchange body: Pharmacia, S-Sepharose FF 1L

Buffer solution A: 0.02 mol/L-phosphate buffer solution (pH 7.0)

20 Buffer solution B: 0.02 mol/L-phosphate buffer solution (pH 8.5)

Buffer solution C: 0.02 mol/L-phosphate buffer solution (pH 8.0), 0.20 mol/L-NaCl

Flow rate: 60 mL/min

Following the manufacturer's instruction, column conditions were fixed.

25 Subsequently, the column was equilibrated with the buffer solution A (about 2 L

which was about 2 times the volume of the column). Equilibration was finished when pH of the eluate was confirmed to be 7.0. 6 L of the culture supernatant concentrate obtained in 3) was diluted to a 2-fold amount with MilliQ water (ultra-pure water produced by an apparatus manufactured by Millipore Co.), and then loaded on the column.

[0047]

Subsequently, inside of the column was washed with the buffer solution B till pH of the eluate from the column became 8.0 (about 2.5 L which was about 2.5 times the volume of the column). In order to remove protease decomposition products (impurities) of the monoclonal antibody, the pH of the buffer solution B was optimally adjusted to 8.5 which was somewhat lower than the isoelectric point.

[0048]

After washing, the adsorbate was eluted with the buffer solution C. Appearance of elution of the monoclonal antibody was monitored in terms of the absorbance at 280 nm. After elution of about 1 L of eluate waste solution, the monoclonal antibody was eluted to obtain about 1 L of crude monoclonal antibody. The monoclonal antibody contained in 1 L was determined to be 4.63 g by HPLC.

[0049]

5) Separation of monoclonal antibody by affinity chromatography

Substances:

Column: Pharmacia, BPG 100/500

Affinity support: Repligen IPA-400 1 L

Buffer solution A: 0.02 mol/L-phosphate buffer solution, 0.20 mol/L-NaCl (pH

8.0)

Buffer solution B: 0.10 mol/L-acetic acid, 0.50 mol/L-NaCl (pH 3.5)

Buffer solution C: 0.50 mol/L-Tris buffer solution (pH 7.5)

Flow rate: 60 to 70 mL/min

5 Following the manufacturer's instruction, column conditions were fixed. Subsequently, the column was equilibrated with the buffer solution A (about 2 L which was about 2 times the volume of the column). Equilibration was finished when pH of the eluate was confirmed to become 8.0. About 1 L of the crude monoclonal antibody-containing aqueous solution obtained in 4) was
10 loaded on the column.

[0050]

Thereafter, inside of the column was washed with the buffer solution A (about 3 L which was about three times the volume of the column) till the pH of the eluate from the column became 8.0.

15 [0051]

After washing, the adsorbate was eluted with the buffer solution B. Appearance of elution of the monoclonal antibody was monitored in terms of the absorbance at 280 nm. After elution of about 1 L of eluate waste solution, the monoclonal antibody was eluted to obtain about 1 L of crude monoclonal
20 antibody-containing aqueous solution. In order to increase pH of the thus-obtained aqueous solution to about neutrality, the eluate was immediately diluted with the buffer solution C to a volume of 2 L. The monoclonal antibody contained in 2 L was determined to be 4.31 g by HPLC.

[0052]

25 6) Concentration of the monoclonal antibody by ultra-filtration

An object of this procedure is to reduce the sample-loading amount in the procedure of 5) to exchange the buffer solution, thus shortening the time required for purification.

[0053]

5 As the ultra-filtration membrane, a filter membrane having a molecular weight cut off of 10,000 (Filtron miniset FS002K01, manufactured by Fuji Filter Co.) was used. As the circulating pump, a perista pump (Master-flex PA25A manufactured by Cole-Parmer) was used. The filtrate was allowed to flow out with using no filtrate-withdrawing pump.

10 [0054]

The crude monoclonal antibody-containing aqueous solution obtained in 5) was circulated through the filter membrane, following the manufacturer's instruction. Foaming did not matter and, therefore, filtration can be conducted with good efficiency by adjusting the flow rate of the circulating pump so that
15 the liquid pressure at the inlet of the filter membrane was kept at about 1.0 kg/cm².

[0055]

The molecular weight of the desired monoclonal antibody is about 150,000, and the cut-off molecular weight of the ultra-filtration membrane is
20 10,000. Therefore, only components having a low molecular weight pass through the filter membrane, and the monoclonal antibody is concentrated. After concentrating 2 L of the filtrate obtained in 5) to about 0.1 L, the monoclonal antibody remaining within the ultra-filtration membrane was washed out with the washing solution to obtain 0.5 L of a solution in total
25 amount.

[0056]

7) Exchange of the buffer solution by using gel filtration support

A standard gel filtration support (i.e., Sephadex G-25, Coarse, Medium, Fine or Superfine; manufactured by Pharmacia Co.) is used for the following tests. A standard gel filtration support having been popularly used with satisfactory results (for example, Sephadex G-25, Coarse, Medium, Fine or Superfine manufactured by Sigma Co.) should be used.

[0057]

The concentrate obtained in 6) contains about 0.05 mol/L of acetic acid, about 0.25 mol/L of NaCl, and about 0.25 mol/L of the Tris buffer solution. Therefore, the concentrate has such a high inorganic ion concentration that use of the concentrate as such makes it insufficient to remove impurities by anion exchange chromatography in the subsequent step. An object of this procedure is to reduce the inorganic ion concentration so that no troubles would be involved in the anion exchange chromatography. Exchange of buffer solution using the gel filtration support serves to reduce the inorganic ion concentration and reduce the contamination amount of impurities.

Substances:

Column: Pharmacia, BPG 100/500

Ion exchange body: Pharmacia Sephadex G-25, Medium 2 L

Buffer solution A: 0.17 mol/L-acetic acid buffer solution (pH 5.0)

Buffer solution B: 0.05 mol/L-Tris (pH 8.3)

Flow rate: 60 to 70 mL/min

Following the manufacturer's instruction, column conditions were fixed.

Since the ion exchange body within the column had previously been sterilized

with 0.2N-NaOH, the column content was neutralized with the buffer solution A (about 4 L which was about two times the volume of the column). The neutralization was stopped when pH of the effused solution became 5.0. Subsequently, the column was equilibrated with the buffer solution B (about 4 L
5 which was about twice the volume of the column). Equilibration was stopped when pH of the effused solution became 8.3. About 0.5 L of the monoclonal antibody concentrate obtained in 6) was loaded on the column.

[0058]

Thereafter, the monoclonal antibody was eluted with the buffer solution
10 B. Appearance of elution of the monoclonal antibody was monitored in terms of the absorbance at 280 nm. After elution of about 1 L of waste solution, the monoclonal antibody was eluted to yield about 1 L of crude monoclonal antibody.

[0059]

15 8) Removal of impurities by anion exchange chromatography

The crude monoclonal antibody-containing aqueous solution obtained in 7) is contaminated with a trace amount of Protein A, monoclonal antibody-Protein A composite, DNA derived from hybridoma cells, and pyrogens (mainly lipopolysaccharides). These contaminants can be removed
20 by anion exchange chromatography under proper conditions.

[0060]

The monoclonal antibody produced by V3 β 1F4 strain has an isoelectric point of about pH 8.80 to about 9.05, thus being positively charged in an aqueous solution of less than 8.80 in pH. Therefore, when a buffer solution
25 having a pH of less than 8.80 is used, the monoclonal antibody does not adsorb

on the anion exchange body.

[0061]

On the other hand, the isoelectric point of Protein A and the isoelectric point of the monoclonal antibody-Protein A composite were found to be 4.85 to 5.1 and 7.1 to 8.2, respectively, by isoelectric point electrophoresis. Therefore, Protein A and the monoclonal antibody-Protein A composite are negatively charged in an aqueous solution of 8.3 or more in pH.

[0062]

Also, DNA and pyrogens are negatively charged in an aqueous solution. From these facts, when anion exchange chromatography is conducted at a pH of 8.3 to 8.7, the impurities can be adsorbed on the ion exchange body, with the desired monoclonal antibody alone passing through the column.

Substances:

Column: Pharmacia, BPG 100/500

Ion exchange body: Pharmacia DEAE-Sephacel 1 L

Buffer solution A: 0.17 mol/L-acetic acid buffer solution (pH 5.0)

Buffer solution B: 0.05 mol/L-Tris (pH 8.3)

Buffer solution C: 0.17 mol/L-acetic acid buffer solution, 0.50 mol/L-NaCl

Flow rate: 60 mL/min

Following the manufacturer's instruction, column conditions were fixed. Since the ion exchange body within the column had previously been sterilized with 0.2N-NaOH, the column content was neutralized with the buffer solution A (about 2 L which was about two times the volume of the column). The neutralization was stopped when pH of the effused solution became 5.0.

Subsequently, the column was equilibrated with the buffer solution B (about 2 L which was about twice the volume of the column). Equilibration was stopped when pH of the effused solution became 8.3. About 1 L of the monoclonal antibody concentrate obtained in 7) was loaded on the column.

5 [0063]

Thereafter, the monoclonal antibody was eluted with the buffer solution B. Appearance of elution of the monoclonal antibody was monitored in terms of the absorbance at 280 nm. After elution of about 0.5 L of waste solution, the monoclonal antibody was eluted to yield about 1 L of a crude monoclonal
10 antibody-containing aqueous solution. In order to deadsorb the impurities adsorbed on the ion exchange body, the column was washed with about 2 L of the buffer solution C. The monoclonal antibody contained in 1 L was determined to be 4.31 g by HPLC.

[0064]

15 9) Concentration of the monoclonal antibody by ultra-filtration

An object of this procedure is to reduce the sample-loading amount in the procedure 10) of exchanging the buffer solution, thereby shortening the time required for purification. Apparatuses and conditions for the ultra-filtration are according to 6). After concentrating about 1 L of the filtrate
20 obtained in 8) to about 0.1 L, the monoclonal antibody remaining within the ultra-filtration was washed out to make the total amount 0.25 L.

[0065]

10) Exchange of buffer solution by using a gel filtration support

In the case of forming a preparation of a monoclonal antibody,
25 particularly, a freeze-dried preparation, it is preferred to prepare a saline

aqueous solution. An object of this procedure is to prepare a saline aqueous solution from the Tris buffer solution of the monoclonal antibody obtained in 9).

[0066]

Apparatuses and conditions for exchanging the buffer solution are
5 according to 7).

Substances:

Column: Pharmacia, BPG 100/500

Ion exchange body: Pharmacia Sephadex G-25, Medium 2 L

Buffer solution A: 0.17 mol/L-acetic acid buffer solution (pH 5.0)

10 Saline solution: Manufactured by Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd., for injection use (The Japanese Pharmacopoeia)

Flow rate: 60 mL/min

Since the ion exchange body within the column had previously been sterilized with 0.2N-NaOH, the column content was neutralized with the buffer
15 solution A (about 4 L which was about two times the volume of the column). The neutralization was stopped when pH of the effused solution became 5.0. Subsequently, the column was equilibrated with the saline solution (about 6 L which was about three times the volume of the column). After equilibration, about 0.25 L of the monoclonal antibody concentrate obtained in 9) was loaded
20 on the column.

[0067]

The monoclonal antibody was eluted with the saline solution. Appearance of elution of the monoclonal antibody was monitored in terms of the absorbance at 280 nm. After elution of about 1 L of waste solution, the
25 monoclonal antibody was eluted to yield about 1 L of a final solution of purified

crude monoclonal antibody.

[0068]

11) Purity of the monoclonal antibody

The amount of contaminated DNA in the aqueous solution of purified
5 monoclonal antibody obtained in 10) was measured according to the DNA
probe method based on radioisotope labeling (principles thereof being
described in several technical books; e.g., Puro-no-tameno Haiteku Joho
Biotechnology Series DNA Probe Gijutsu-to-Oyo, written by Toyozo Takahashi,
published by CMC on Feb. 5, 1988, p.5 et seq.), and was found to be 0.025 pg
10 per 1 mg of the antibody. This level is low enough for use of monoclonal
antibody as a medicine with causing almost no problems.

[0069]

Also, the amount of protein A which might be mixed into the antibody in
the procedure of 5) was measured according to the ELISA method, and was
15 found to be less than 0.03 ng per 1 mg of the antibody (which is less than the
detection limit). This level is also low enough to scarcely cause a problem.

[0070]

The invention has been described by referring to the monoclonal
antibody as a representative example, but the invention is not limited to only the
20 monoclonal antibody but can be utilized for various proteins.

[Abstract]

[Object] Process for purifying a protein, which is particularly effective for a protein having specific physical properties.

[Constitution] A process for purifying a protein, which is characterized by using

- 5 (a) a cation exchange column equilibrated at a pH lower than the isoelectric point of a desired protein, (b) an affinity chromatography column, and (c) an anion exchange column equilibrated at a pH lower than the isoelectric point of the desired protein.